

ÄNDERUNGEN IM PRPP-GEHALT UND IN DER
PRPP-"GENERATION" MENSCHLICHER
ERYTHROZYTE NACH ORALER
XYLITVERABREICHUNG UND WÄHREND
KONSTANTER XYLITINFUSION

KLAUS STOCKER

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor Prof. Dr. W. Seitz

Änderungen im PRPP-Gehalt und in der PRPP-"generation"
menschlicher Erythrozyten nach oraler Xylitverabreichung
und während konstanter Xylitinfusion



Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Stocker

aus
München

1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. W. Kaiser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 11. 1973



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Abkürzungen	1
II. Einleitung	2
III. Methodik	6
A. Versuchspersonen	
B. Versuchsablauf	
C. Bestimmungsmethoden	
1. Materialien	
2. Bestimmung der Serumharnsäure	
3. Bestimmung von PRPP und PRPP-generation	
IV. Eigene Untersuchungen	11
A. Orale Xylitverabreichung	
1. Verhalten der Serumharnsäure	
2. Verhalten der PRPP-Spiegel in den Erythrozyten	
3. Verhalten der PRPP-generation	
B. Langzeitinfusionen mit Xylit in verschiedenen Konzentrationen	
1. Verhalten der Serumharnsäure	
2. Verhalten der intraerythrozytären PRPP-Spiegel	
3. Verhalten der PRPP-generation	
V. Diskussion	19
VI. Zusammenfassung	24
VII. Abbildungen	25
VIII. Literaturübersicht	36
IX. Lebenslauf	39

I. Abkürzungen

PRPP	5-Phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphat
R-5-P	Ribose-5-phosphat
R-1-P	Ribose-1-phosphat
NADF	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
O-5-MP	Orotidin-5-monophosphat
U-5-MP	Uridin-5-monophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CDP	Cytidindiphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
OPRTase	Orotsäure-Phosphoribosyltransferase (E.C.2.4.2.10)
HGPRTase	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (E.C.2.4.2.8)
APRTase	Adenin-Phosphoribosyltransferase (E.C.2.4.2.7)
ODCase	Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase (E.C.4.1.1.23)

II. Einleitung

Das energiereiche Zuckerderivat Phosphoribosylpyrophosphat ist als Substrat für Phosphoribosyltransferasen eng mit dem Nukleotidstoffwechsel der Zelle verknüpft. Die intrazelluläre PRPP-Konzentration scheint eine wichtige Rolle in der Regulation des Purinmetabolismus beim Menschen zu spielen (1,2,3).

PRPP besteht aus dem Zucker D-Ribose, der in Stellung 5 einen Monophosphat- und in Stellung 1 einen Pyrophosphatanteil trägt. Seine Synthese katalysiert das Enzym PRPP-Synthetase aus Ribose-5-Phosphat und ATP in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen und anorganischem Phosphat (4,5,6; Abb. 1), es liegt in der Zelle wahrscheinlich als Mg^{++} -PRPP-Komplex vor. R-5-P entsteht aus Glykolysezwischenprodukten über den oxydativen oder den nicht-oxydativen Weg des Pentosephosphatzyklus (Abb. 1).

Glukose und Fruktose erhöhen die PRPP-Synthese, Jodazetat und Dinitrophenol hemmen die Neubildung (7).

Methylenblau führt in vitro in Ehrlichs Aszites Tumorzellen (7), in Fibroblastenkulturen (3) und in menschlichen Erythrozyten über eine erhöhte NADP-Regeneration und damit gesteigerten Umsatz des oxydativen Teiles des Pentosephosphatshunts zu gesteigerter R-5-P-Bildung und erhöhten intrazellulären PRPP-Spiegeln.

Eine weitere Quelle für R-5-P bilden die Purin- und Pyrimidinnukleoside. Nach Phosphorolyse dieser Substanzen entsteht R-1-P, das über das Enzym Phosphoribomutase in R-5-P umgewandelt werden kann (9).

Die PRPP-Synthese der Zelle wird außer durch das Angebot an R-5-P noch durch die Hemmwirkung bestimmter Metabolite auf die PRPP-Synthetase reguliert. Die Aktivität bakterieller PRPP-Synthetase wird durch Purin- und Pyrimidinnukleotide, vor allem durch ADP, GTP, CTP, UTP und auch durch Tryptophan kontrolliert (5). Gereinigte PRPP-Synthetase von Ehrlichs Aszites Tumorzellen wird durch eine große Anzahl von Nukleotiden gehemmt (6).

Die Geschwindigkeit der PRPP-Synthese in intakten menschlichen Erythrozyten wird vor allem durch den Gehalt an R-5-P und an anorganischem Phosphat bestimmt, in Hämolyisaten fanden Hershko et al. eine starke Hemmung durch ADP, GDP und 2,3-Diphosphoglyzerat, in geringerem Ausmaß auch durch AMP, UMP, CMP, UDP und GUP (8). Sie interpretierten dieses Ergebnis in Anlehnung an Atkinson und Fall (10) als eine Möglichkeit der Zelle über ihren Energiezustand die PRPP-Synthese zu steuern, bei ATP-Mangel mit einer Verschiebung des ATP zu ADP Verhältnisses wird vermieden, daß die Zelle weitere Energie für die PRPP-Neubildung aufwendet. Ob das Produkt PRPP selbst ein Hemmstoff für die PRPP-Synthetase ist, ist noch nicht vollständig geklärt.

Die Höhe des intrazellulären PRPP-Spiegels wird neben der Neubildung durch den Verbrauch bestimmt. PRPP ist Substrat für eine große Anzahl von Phosphoribosyltransferasen, die die Übertragung von R-5-P auf eine Stickstoffbase unter Abspaltung von Pyrophosphat katalysieren. Als Stickstoffrezeptor kommen im Bereich des Nukleinsäurestoffwechsels Orotsäure bei der Pyrimidinsynthese (OPRTase), Hypoxanthin, Xanthin, Guanin und Adenin bei der Purinreutilisation im salvage pathway des Purinabbaus (HGPRTase und APRTase) und Glutamin für die PRPP-Amidotransferase bei der de novo Purinsynthese in Frage (11). Die Bildung von Phosphoribosylamin, der ersten spezifischen Purinvorstufe, aus Glutamin und PRPP durch die Amidotransferase ist der geschwindigkeitsbestimmende und damit kontrollierende Schritt der Purin-neubildung. Von hier aus teilt sich der Stoffwechselweg bis zur Bildung von Inosin-5-Phosphat nicht mehr, die Zwischenprodukte der Folgeenzyme kumulieren nicht (12,13) und scheinen auch endogen nicht beeinflussbar zu sein (14). Die Enzymaktivität wird durch die Feedbackhemmung der Purinribonukleotide (15), durch das Angebot an Glutamin und durch die intrazelluläre PRPP-Konzentration reguliert.

So führt eine Änderung des intrazellulären PRPP-Spiegels wie sie bei verschiedenen Krankheiten und Medikamenten auftritt zu einer Erhöhung, bzw. Senkung der Purin-de-novo-Synthese. Kelley et al. zeigten, daß eine Senkung der PRPP-Konzentration durch Orotsäure (PRPP wird vermehrt zur OMP-Bildung verbraucht) in vivo und in menschlichen Fibroblastenkulturen (17) zu einer Verminderung der Purinneubildung führt. Auch die Verabreichung des Xanthinoxidasehemmers Allopurinol gibt einen Abfall des PRPP-Gehalts bis zu 50% des Ausgangswertes in den Erythrozyten der Patienten (18) und zeigt eine Hemmung der de novo Purinsynthese in Fibroblastenkulturen (19). PRPP wird dabei teilweise zur Bildung des Allopurinolribonukleotids verwandt, das als Hemmsubstanz der PRPP-Amidotransferase bekannt ist, beide Vorgänge scheinen die Verminderung der Purinsynthese zu bewirken. Eine ähnliche Rolle spielen Adenin und 2,6-Diaminopurin. Methylenblau erniedrigt (wie oben erwähnt) die intrazelluläre PRPP-Konzentration in menschlichen Erythrozyten, in Ehrlichs Aszites Tumorzellen (7) und in Fibroblastenkulturen (3) und steigert auch die Purin-de-novo-Synthese (3).

Einige Formen der primären Gicht zeigen erhöhte PRPP-Spiegel und gesteigerte Purinneubildung. Neben dem Lesch-Nyhan Syndrom, einer Stoffwechselerkrankung mit komplettem HGPRTase-Mangel, wurde eine inkomplette Form gefunden, die außer den Folgen der Hyperurikämie nur geringe neurologische Ausfälle zeigte (1,20).

Außerdem beschreiben Henderson et al. zwei Patienten mit Hyperurikämie, bei denen zu den erhöhten intrazellulären PRPP-Spiegeln und erhöhter de novo Purinsynthese auch veränderte Eigenschaften der PRPP-Amidotransferase gefunden wurden (21).

Als Normwerte für den PRPP-Gehalt der Humanerythrozyten werden in der Literatur $3,1 \pm 0,5$ (1), $4,4 \pm 1,8$ (18) und $6,1 \pm 3,14$ (22) nMol/ml packed cells angegeben. Die

intrazelluläre PRPP-Konzentration wird durch die oben erwähnten Einflüsse auf die Neusynthese und die Weiterverwendung bestimmt, sie steht in engem Zusammenhang mit dem Purinstoffwechsel (de novo Purinsynthese, Purinreutilisation) und der Pyrimidinsynthese.

Unser Interesse galt einer sekundären Form der Hyperurikämie. Orale und rasche intravenöse Gabe (0,5 g/kg in 10 Min.) hoher Dosen von Fruktose führen nach den Untersuchungen von Perheentupa et al. (23) und Fox et al. (24) zu einer signifikanten Erhöhung der Serumharnsäurewerte. Langzeitinfusionen mit Fruktose (0,5 g/kg/hr) über fünf Stunden zeigen keine Änderung der Harnsäurewerte, während bei Xylitinfusionen der gleichen Konzentration ein stärkerer Harnsäureanstieg als bei Fruktoseinfusionen mit dreifach höherer Konzentration beobachtet werden kann (25,26). Auch bei oraler Gabe gleicher Mengen von Xylit und Fruktose (50 Gramm) steigt der Harnsäurespiegel bei Xylit stärker an. Als Ursache dieser Fruktose-, bzw. Xylitinduzierten Hyperurikämie kommen neben einer Änderung des Harnsäurepools oder einer verminderten renalen Ausscheidung (hierfür würde die bei Fruktoseinfusionen beobachtete Hyperlactazidämie sprechen (27)) eine gesteigerte de novo Purinsynthese, zum Beispiel als Folge einer erhöhten PRPP-Synthese, da Xylit eine direkte Vorstufe von R-5-P ist, oder ein beschleunigter Abbau der Purinribonukleotide in Frage. Da das intrazelluläre PRPP einerseits die Geschwindigkeit der Purin-de-novo-Synthese reguliert, andererseits aber auch Substrat für die Enzyme der Purinreutilisation ist, bestimmten wir die Höhe der PRPP-Spiegel und, um eine quantitative Aussage über die PRPP-Synthesebedingungen zu erhalten, die PRPP-generation in Erythrozyten nach oraler Gabe von Xylit und während Xylitlangzeitinfusionen. Die verwendete Methode zur quantitativen Bestimmung von PRPP und der PRPP-generation wurde dazu neu entwickelt (28).

III. Methodik

A. Versuchspersonen

Die Untersuchungen wurden mit freiwilligen, gesunden, männlichen Probanden im Alter von 20 bis 30 Jahren durchgeführt. Die Serumharnsäurewerte aller Versuchspersonen lagen vor Versuchsbeginn im Normbereich (unter 6,1 mg%). Die Probanden waren 12 Stunden vor und während des Versuchs nüchtern.

B. Versuchsablauf

1. Orale Xylitverabreichung

Die Versuchspersonen tranken eine Lösung von 50 Gramm Xylit in 400 ml Leitungswasser in der ersten halben Stunde nach Abnahme des Nullwertes. Weitere venöse Blutabnahmen (etwa 15 ml) 30, 60, 120, 180, 240 Minuten und sieben Stunden nach der ersten Blutentnahme zur Bestimmung von Serumharnsäure, PRFP und PRFP-generation.

2. Xylitlangzeitinfusionen

Die Versuchspersonen erhielten über eine Braunsche Kanüle in einer Kubitalvene nach einer Vorinfusion mit 0,9% NaCl und Abnahme des Nullwertes durch ein Perfusionsgerät vier bis fünf Stunden lang konstant eine Xylitlösung mit Konzentrationen von 0,3 - 0,5g/kg Körpergewicht/Stunde infundiert. Blutentnahmen 15, 45, 75, 135, 195 und 280 Minuten nach Abnahme des Nullwertes und 30 Minuten nach Infusionsende aus einer Vene des anderen Armes.

C. Bestimmungsmethoden

1. Materialien

Alle Reagenzien waren von höchster Reinheit und wurden in destilliertem Wasser gelöst. Radioaktive Orotsäure wurde von New England Nuclear (Frankfurt) bezogen: NEC-176 Orotic-carboxyl-C¹⁴ acid hydrate, spezifische Aktivität 10,2 mC/mM. Die Lösung dieser Substanz in

aqua dest. zeigt auch bei längerer Lagerung im Kühlschrank nur geringe Spontandecarboxylierung. PRPP-MgCl₂ wurde bei Serva (Heidelberg) gekauft, OPRTase und ODCase aus Bierhefe stammen von Boehringer (Mannheim). Die Enzyme liegen als Gemisch oder Komplex vor, eine weitere Auftrennung des gelieferten Proteins in der Disk-Elektrophorese ergab mindestens fünf Banden, die jedoch nicht weiter untersucht wurden.

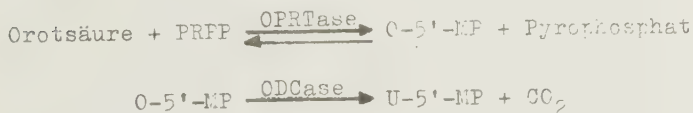
2. Bestimmung der Serumharnsäure

Doppelbestimmungen der Serumharnsäure wurden enzymatisch mit Uricase nach der Methode von Zöllner (29) durchgeführt.

3. Bestimmung von PRPP und der PRPP-Generation in Erythrozyten

a. Prinzip

Zur quantitativen Bestimmung von PRPP sind theoretisch alle Reaktionen der Phosphoribosyltransferasen geeignet. Mit den Enzymen HGPRase (18) und APRTase (18) aus Erythrozyten wurden verschiedene radioaktive Bestimmungsmethoden entwickelt. Bei all diesen Methoden müssen die entstehenden Nukleotide von ihren Vorstufen getrennt werden. Dieser Arbeitsgang ist aufwendig und stellt eine zusätzliche Fehlerquelle dar. Aus diesem Grund wählten uns die Reaktion



besser geeignet. Aus Orotsäure, die in der Carboxylgruppe mit ¹⁴C markiert ist, wird im zweiten Reaktionsschritt radioaktives CO₂ abgespalten, das leicht quantitativ bestimmt werden kann und das stöchiometrisch zum verbrauchten PRPP ist. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß die benötigten Enzyme ausreichend gereinigt kommerziell erhältlich sind und daß die Gesamt-

reaktion im Gegensatz zu den oben genannten Phosphoribosyltransferasereaktionen irreversibel ist und damit das vorgegebene PRPP vollkommen umgewandelt werden kann.

b. Durchführung des Tests zur PRPP-Bestimmung

1.) 10 - 15 ml Blut sofort nach der Entnahme mit ca. 500 IE Heparin mischen und 7 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren. Anschließend die sedimentierten Erythrozyten zwei Mal mit je 10 ml NaCl (0,9%; 4°C) waschen.

2.) Herstellung der Erythrozytensuspension zur mechanischen Hämolyse.

(a) gewaschene Erythrozyten

(b) EDTA-Lösung (2 mmolar)

(c) Glycyl-Glycin-Puffer (0,1 molar; pH 8,0 mit $MgCl_2$ 6mmolar), der 45 mMol 2,3-Diphosphoglycerat/ml Puffer enthält.

Die Volumina von (a):(b):(c) verhalten sich 1:2:3, alle Lösungen sind gekühlt.

3.) Mechanische Hämolyse mit einem Ultraturraxgerät (Fa. Kunkel)

4.) Inkubationsansatz (in Warburggefäßen)

1 bzw. 2 ml Hämolysat

+ 0,1 ml Enzymlösung (20 mg OPRTase-ODCasekomplex/ml Puffer)

+ 0,1 ml ^{14}C -Orotsäurelösung (1 uCi; 0,1 mmolar)

in den äußeren Ring, in das Zentrum des Gefäßes 0,4 ml KOH (4 normal), 30 Minuten Inkubation bei 37°C.

5.) Stoppen der Reaktion mit 1 ml $HClO_4$ (1,5 molar), die geschlossenen Gefäße eine Stunde zur Absorption des durch das Ansäuern ausgetriebenen CO_2 stehen lassen. KOH mit 13,5 ml Aquasol mischen und die Radioaktivität (cpm) in einem Tri Carb liquid Szintillationszähler messen.

c. Bestimmung der PRPP-generation

Ansatz entsprechend der PRPP-Bestimmung, jedoch enthält

der Glycyl-Glycin-Puffer kein 2,3-Dihydroxyglycerat. Die Neusynthese von PRPP im Hämolysat kann während der Inkubation ungehemmt ablaufen.

d. Eigenschaften des Tests

- 1.) Als optimale Testbedingungen wurden nach (28) ausgearbeitet: pH-Optimum bei 8,0; Magnesiumkonzentration über 2×10^{-3} molar; Enzymkonzentration 2 mg/Testansatz. Beide Enzyme liegen bei dieser Konzentration in Überschuß vor, die Inkubationszeit von 30 Minuten ergibt eine gute Ausbeute.
- 2.) Die Reaktion ist für PRPP absolut spezifisch. Neben Orotsäure katalysiert OPRTase 5-Fluor-Orotsäure. Andere Orotsäurederivate, sowie Purin- und Pyrimidinbasen reagieren nicht.
- 3.) Das Hämolysat wurde nicht durch Erhitzen enteiweißt, da PRPP sehr thermolabil ist. Zur Unterdrückung der PRPP-Synthese im Hämolysat während der Inkubation benutzten wir nach Sperling et al. (22) 2,3-Diphosphoglycerat, das unter unseren Bedingungen in einer Konzentration von 35 - 90 mMol/Inkubationsansatz die PRPP-Synthetase vollständig hemmt. Alle anderen im Hämolysat vorhandenen Phosphoribosyltransferasen spielen unter diesen Testbedingungen keine Rolle und können außerdem durch eine Eichkurve mit zum 2,3-DPG-Hämolysat zugegebenem PRPP weitgehend eliminiert werden.
- 4.) Eichkurven, die zu den Versuchsreihen mitbestimmt wurden, zeigten unter den Testbedingungen einen linearen Anstieg bis etwa 100 mMol PRPP.
- 5.) PRPP wurde im Triplikat bestimmt, die Einzelwerte schwankten um etwa $\pm 5\%$. Zur Korrektur von Volumenschwankungen der Erythrozyten während des Versuchs und zum Ausgleich unterschiedlicher Sedimentation der Erythrozyten wurde die Hämoglobinkonzentration der Hämolysate bestimmt und das Volumen der jeweils eingesetzte Erythrozytensuspension entsprechend korrigiert. Die Normwerte für den PRPP-Gehalt in einem Milliliter

gewaschener Erythrozyten lagen im Bereich 2,5 - 4,5 % und stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (siehe Einleitung).

V. Eigene Untersuchungen

A. Orale Verabreichung von 50 g Xylit

1. Verhalten der Serumharnsäure (Abb. 2)

Orale Gabe einer Lösung von 50 g Xylit in 400 ml Wasser während einer halben Stunde führt bei unseren Versuchspersonen zu einem raschen, verschieden hohen Anstieg der Serumharnsäurewerte um 1,55 - 2,9 mg% (+27 - 69% des Ausgangswertes) in den ersten beiden Stunden. Danach fallen die Werte langsam ab, sind jedoch in allen Fällen sieben Stunden nach Versuchsbeginn noch erhöht (0,75 - 1,8 mg%; +14 - 44% des Ausgangswertes). Der steilste Anstieg findet sich schon in der Verabreichungsphase. In zwei Fällen (wovon einer wegen fehlender FRPP-Bestimmung nicht in der Abbildung dargestellt wurde) steigt die Harnsäure nach 240 Minuten nochmal an.

Infusionszeit (min)		0	30	60	120	180	240	420
Serumharnsäure (mg%)	I	5,65	6,40	7,20	6,70	6,75	6,45	6,90
	II	5,75	7,05	7,80	7,40	7,05	6,70	6,55
	III	4,20	5,15	6,15	7,10	6,50	6,20	6,05

Verhalten der intrazellulären PRPP-Spiegel (Abb. 2)

Das Verhalten der intrazellulären PRPP-Spiegel ist nicht einheitlich. Bei zwei Versuchspersonen fällt die PRPP-Konzentration in den ersten zwei Stunden ab (1 - 1,5 nMol; bis -35% des Ausgangswertes; der Umkehrpunkt entspricht dem Serumharnsäuregipfel), steigt dann bis 240 Minuten wieder an, ohne jedoch die Ausgangshöhe zu erreichen, und fällt danach wieder ab. Ein Proband zeigt einen Anstieg mit Gipfel in der ersten Stunde (0,65 nMol; +27% des Nullwertes), gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall bis zum Endwert.

Alle Endwerte liegen unter dem Ausgangswert (1 - 2,8 nMol; -37 bis 74% des Ausgangswertes) und auch unter dem Wendepunkt des ersten Abfalls. Der Wiederanstieg bei 240 Minuten erreicht ebenfalls nicht die Höhe des Ausgangswertes.

Infusionszeit (min)		0	30	60	120	180	240	420
PRPP	I	2,90	-	-	1,93	2,20	2,80	1,83
(nMol/ml Ery-	II	2,45	2,76	3,10	2,20	-	1,50	1,20
throzyten)	III	3,73	2,80	2,25	2,40	2,85	3,10	0,90

3. Verhalten der PRFP-generation (Abb. 4)

Die PRFP-generation steigt in allen Fällen (in einem Versuch nach einem kurzen Abfall) bis 180 bzw. 240 Minuten an (1,5 - 4 facher Ausgangswert) und fällt dann zum Endwert ab, erreicht jedoch nur in einem Fall die Ausgangshöhe.

Infusionszeit (min)		0	30	60	120	180	240	420
PRFP-generation I		0,90	0,60	0,74	1,30	-	1,85	1,75
(cpm x 10 ⁵ /0,25ml II		1,05	1,20	1,32	1,50	1,70	0,92	0,80
Erythrozyten) III		0,58	-	1,40	2,05	-	2,20	1,57

B. Langzeitinfusionen mit Xylit in verschiedenen Kon-
zentrationen (0,3 - 0,5 g/kg Körpergewicht/Stunde)

1. Verhalten der Serumharnsäure (Abb. 5)

Alle Versuchspersonen zeigen ein Ansteigen der Serumharnsäurewerte bis 75 Minuten nach Infusionsbeginn (0,4 - 3,0 mg%; +7 bis 50% des Ausgangswertes), die stärkste Erhöhung findet sich in den ersten 15 Minuten. Der weitere Verlauf ist uneinheitlich. In den meisten Versuchen fällt die Serumharnsäure langsam ab oder bleibt konstant, bei zwei Probanden steigt sie jedoch weiter bis zum Infusionsende an. 30 Minuten nach der Infusion sind die meisten Harnsäurewerte abgefallen, sie haben jedoch noch nicht das Ausgangsniveau erreicht (+0,1 bis 2,0 mg%; +1,8 bis 40% des Nullwertes).

Die Serumharnsäureerhöhung scheint von der infundierten Xylitmenge abhängig zu sein, die stärksten Anstiege zeigen sich bei den höheren Konzentrationen.

(Tabelle der Werte Seite 15)

Zeit	0	15	45	75	105	135	165	195	225
0,3 ₁	6,05	6,35	6,60	-	6,75	-	6,85	-	7,00
0,3 ₂	5,25	-	-	6,25	-	6,10	-	6,10	-
0,4 ₁	5,65	6,05	-	6,05	-	5,80	-	5,70	-
0,4 ₂	4,90	5,30	-	7,30	7,20	-	7,05	-	-
0,5 ₁	6,04	6,90	-	9,00	9,15	9,00	8,95	8,95	8,90
0,5 ₂	5,45	-	6,15	-	6,10	-	6,30	-	6,35

Zeit	255	270	285	300	315	330	400
0,3 ₁	-	-	6,80	-	-	6,55	-
0,3 ₂	6,10	-	-	-	6,15	-	6,25
0,4 ₁	-	-	-	5,80	-	5,75	-
0,4 ₂	-	-	7,05	-	-	6,90	-
0,5 ₁	-	-	8,50	-	7,50	-	-
0,5 ₂	-	6,15	-	-	-	-	-

Erste Zeile: Infusionszeit (min)

Zweite bis siebte Zeile: Serumharnsäurewerte (mg%),
aufgeschlüsselt nach den Xylitkonzentrationen 0,3 -
0,5 g/kg Körpergewicht/Stunde, jeweils zwei Versuche

2. Verhalten der intraerythrozytären PRPP-Spiegel

(Abb. 6;7;8)

Außer bei einem Versuch mit der niederen Dosierung (0,3 g/kg FG/Std) fallen bei allen Versuchspersonen die intrazellulären PRPP-Spiegel in der Anfangsphase bis 75 Minuten ab (0,25 - 1,3 nMol; -9 bis 51% des Ausgangswertes), danach bleibt der PRPP-Gehalt bis zum Infusionsende ziemlich konstant. In der Periode nach der Infusion steigt der PRPP-Spiegel in der Hälfte der Fälle wieder gering an, bei den anderen Probanden fällt er noch etwas ab. Der Ausgangswert wird nur bei den Infusionen der niederen Konzentration wieder erreicht, in den Versuchen mit höherer Konzentration liegt der Endwert unter dem Ausgangswert. Die Änderungen der intraerythrozytären PRPP-Spiegel scheinen dosisabhängig zu sein. Bei der niederen Dosierung bleibt der PRPP-Gehalt nahezu konstant, den stärksten Abfall zeigen die Versuche mit der höchsten Xylitkonzentration (Abfall in % des Nullwertes, 0,3₁: 8,6% 0,4_{1;2}: 12; 24,7% 0,5_{1;2}: 26; 61%).

Eine Korrelation zwischen der Erniedrigung der intraerythrozytären PRPP-Konzentration und dem Anstieg der Serumharnsäure scheint nicht zu bestehen, die Versuchsperson (0,5₁) macht eine Ausnahme (siehe B3, Seite 18). (Tabelle der Werte Seite 17)

Zeit	0	15	45	75	105	135	165	195	225
0,3 ₁	2,90	2,80	2,65	-	-	-	2,70	-	2,65
0,3 ₂	1,65	-	-	2,05	-	2,25	-	2,35	-
0,4 ₁	3,65	4,10	-	2,75	-	-	-	2,65	-
0,4 ₂	2,45	2,70	-	3,60	2,15	-	3,10	-	1,20
0,5 ₁	2,15	1,80	1,30	0,90	-	0,80	-	0,75	-
0,5 ₂	3,20	-	2,55	-	2,50	-	2,40	-	2,30

Zeit	255	270	285	315	330
0,3 ₁	-	-	2,70	-	2,90
0,3 ₂	2,30	-	-	2,85	-
0,4 ₁	-	-	2,70	-	3,00
0,4 ₂	-	-	2,25	-	2,15
0,5 ₁	-	-	-	0,80	-
0,5 ₂	-	2,00	-	-	-

Erste Zeile: Infusionszeit (min)

Zweite bis siebte Zeile: Intraerythrozytäre PRPP-Konzentration (nMol/ml Erythrozyten), aufgeschlüsselt nach den Xylitkonzentrationen 0,3 - 0,5 g/kg Körpergewicht/Stunde, je zwei Versuche

Verhalten der PRPP-generation (Abb. 9; 10; 11)

Der Versuch mit der niederen Xylitkonzentration (0,3 g/kg KG/Std) zeigt nur eine geringe Erhöhung der PRPP-generation, während diese bei der Infusion mit der mittleren Dosierung (0,4 g/kg KG/Std) in der ersten Viertelstunde stark ansteigt (2,7 facher Ausgangswert), dann konstant bleibt und in den 30 Minuten nach Infusionsende abfällt ohne jedoch wieder das Ausgangsniveau zu erreichen.

Bei den Versuchspersonen, die die höchste Xylitkonzentration (0,5 g/kg KG/Std) infundiert erhielten, kommt es zu einer signifikanten Verminderung der PRPP-generation im Hämolysat während des gesamten Versuchs. Der Proband mit dem niedrigsten Ausgangswert (0,5₁) weist den größten Abfall im intrazellulären PRPP-Gehalt und den stärksten Harnsäureanstieg auf.

Zeit	0	15	45	75	105	135	195	225	270	315
0,3 ₂	1,36	-	-	1,60	-	1,53	1,45	-	-	1,45
0,4 ₁	0,83	2,25	-	2,13	-	2,25	2,23	-	-	1,56
0,5 ₁	0,40	0,36	-	0,27	-	0,20	0,13	-	-	0,16
0,5 ₂	1,75	-	1,63	-	1,30	-	-	1,36	1,50	-

Erste Zeile: Infusionszeit (min)

Zweite bis siebte Zeile: PRPP-generation im Hämolysat (cpm x 10⁵/0,25 ml gewaschene Erythrozyten), aufgeschlüsselt nach den Xylitkonzentrationen 0,3 - 0,5 g/kg Körpergewicht/Stunde

V. Discussion

Orale Gabe von Xylit (50 g in 30 Minuten) führt in allen unseren Untersuchungen zu einem signifikanten Harnsäureanstieg innerhalb der ersten zwei Stunden, der bis zu sieben Stunden nach Versuchsbeginn bestehen bleibt. Die PRPP-Konzentration in den Erythrozyten fällt dabei in den ersten 120 Minuten bis etwa 35% des Nullwertes ab. In zwei Versuchen kommt es zu einem Wiederanstieg des PRPP-Spiegels mit einem anschließenden zweiten deutlichen Abfall, der bis zu sieben Stunden nach Verabreichung des Xylits anhält. In keiner Untersuchung wird der Ausgangswert in dieser Zeit wieder erreicht. Bestimmt man gleichzeitig mit der PRPP-Konzentration die PRPP-generation im Hämolystat, so erhält man in allen Fällen eine signifikant (zwischen 100 - 400%) erhöhte PRPP-Synthese.

Bei konstanter intravenöser Zufuhr von Xylit während vier bis fünf Stunden kommt es gleichfalls zu einer Erhöhung der Harnsäurekonzentration. Der Harnsäureanstieg zeigt jedoch keine deutliche Korrelation zur verabreichten Dosis. Die PRPP-Konzentration fällt nur bei den höheren Xylitkonzentrationen deutlich ab. Der stärkste Abfall zeigt sich bereits in der ersten Stunde, danach bleibt der niedere PRPP-Spiegel während der gesamten Infusionsperiode nahezu konstant. Der Abfall des PRPP-Gehalts scheint dosisabhängig zu sein. In der PRPP-generation ist lediglich bei der mittleren Konzentration ein rascher, deutlicher Anstieg festzustellen. Bei der höchsten verwendeten Dosis von 0,5 g/kg KG/Std kommt es zu einem signifikanten Abfall während der gesamten Infusion.

Für den in unseren Untersuchungen sowohl nach oraler Gabe von Xylit als auch nach konstanter intravenöser Xylitinfusion beobachteten deutlichen Harnsäureanstieg sind theoretisch vier mögliche Mechanismen zu disku-

1. Verschiebungen im Gesamtkörperpool der Harnsäure
Durch Xylit könnte es innerhalb kurzer Zeit zu einer Verschiebung im Gesamtkörperpool der Harnsäure kommen. Aus Vergleichen mit Versuchen von Perheentupa et al. (23) und von Fox et al. (24) bei Fruktoseinfusionen, die ebenfalls eine Hyperurikämie jedoch geringeren Ausmaßes hervorrufen, deren physiologischer Mechanismus dem Xylitinduzierten Harnsäureanstieg ähnlich sein dürfte, ist dies jedoch unwahrscheinlich. Sie fanden ebenso wie Nehnert und Förster (30,31), daß die Harnsäureernährung unter Fruktosebelastung durch Allopurinolvorbehandlung unterdrückt wird.

2. Beeinträchtigung des renalen Ausscheidungsmechanismus für Harnsäure

Die von uns verwendete Xylitverabreichung könnte zu einer verminderten renalen Exkretion der Harnsäure führen. Zu einer Herabsetzung der renalen Exkretion könnte es durch Änderungen in den Lactat-, Pyruvat- und β -Hydroxybutyratkonzentrationen im Blut, bzw. Serum kommen. Nach den Untersuchungen von Hertz et al. (32) ist der Blutlactatspiegel bei Xylitinfusionen unserer Dosierung nur gering erhöht, die Pyruvat- und β -Hydroxybutyratspiegel zeigen nur insignifikante Schwankungen. Goto et al. (33) beobachteten einen leichten Abfall der Blutlactatwerte nach einmaliger intravenöser Gabe von Xylit in einer Konzentration von 0,1 g/kg Körpergewicht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen ebenso wie das Ausbleiben des Harnsäureanstiegs unter dem Einfluß von Allopurinol gegen einen renalen Mechanismus als Ursache der Xylitinduzierten Hyperurikämie. Auch die Versuche von Fox und Kelley (24) lassen annehmen, daß unter Xylitbelastung die fraktionierte Harnsäureclearance wie bei den Fruktoseinfusionen unverändert bleibt.

3. Reife Purin-de-novo-Synthese

Da Xylit als direkte Vorstufe für R-5-P und damit PRPP gelten kann (Abb. 1), und PRPP eine der geschwindigkeitsbestimmenden Substanzen in der de novo Purinsynthese ist, wäre es möglich, daß der Harnsäureanstieg nach Xylitverabreichung über eine gesteigerte Purin-de-novo-Synthese durch erhöhte PRPP-Neubildung zustande kommt.

Der reife Erythrozyt hat keine Purin-de-novo-Synthese. Er synthetisiert zwar aktiv PRPP und Purinribonukleotide aus freien Basen über die Purinphosphoribosyltransferase-Reaktionen, jedoch ist er unfähig zur Phosphoribosylamin-Synthese. Die direkte Bestimmung der de novo Purinsynthese unter dem Einfluß von Xylit ist in Erythrozyten deshalb nicht möglich. Aus den im Erythrozyten zu messenden Änderungen kann jedoch indirekt auf Einflüsse in anderen Organen, die an der Harnsäuresynthese direkt beteiligt sind (z.B. die Leber), geschlossen werden.

Um zu Aussagen über die im Erythrozyten stattfindenden Änderungen in der PRPP-Synthese unter dem Einfluß von Xylit zu kommen, bestimmten wir die PRPP-generation in den Erythrozyten der Versuchspersonen. Die PRPP-generation mißt das in vitro während einer bestimmten Inkubationszeit im Hämolysat gewaschener Erythrozyten (ohne Vorinkubation) synthetisierte PRPP. Diese Bestimmung gibt eine summarische Aussage über die zum Zeitpunkt der Blutentnahme in vivo vorhandenen Einflüsse (aktuelle Konzentrationen an Substraten, Enzymen und Inhibitoren) auf die PRPP-Synthese im Erythrozyten.

In den meisten unserer Untersuchungen führt Xylit tatsächlich zu einer erhöhten PRPP-generation, bei der höchsten infundierten Xylitkonzentration jedoch kommt es zu einem deutlichen Abfall. In jenen Fällen, bei denen aus der Erhöhung der PRPP-generation eine ge-

steigerte PRPP-Synthese abzuleiten ist, ist eine Harnsäurerhöhung als Folge gesteigerter Purin-de-novo-Synthese zu diskutieren. In den anderen Fällen mit verminderter PRPP-generation ist dieser Mechanismus dagegen unwahrscheinlich. Zu erklären wäre eine verminderte PRPP-generation mit einer Hemmung der PRPP-Synthetase durch neu entstandene Inhibitoren, z.B. ADP, AMP oder GMP (8). Eine weitere Möglichkeit, über die die Hemmung der PRPP-Synthese zustandekommen könnte, wäre ein Abfall des anorganischen Phosphats in den Erythrozyten (8). Eine Erniedrigung der Phosphatkonzentration im Serum unter ähnlich hoher Xylitdosierung wird von Mertz et al. beschrieben (32). Aufgrund unserer Untersuchungen über die PRPP-generation ist eine Erhöhung der de novo Purinsynthese durch Xylit möglich, gegen diesen Mechanismus (zumindest als einzigen Faktor) spricht jedoch die Verminderung der PRPP-generation in den Versuchen mit hoher Xylitdosierung und die Erniedrigung des intraerythrozytären PRPP-Gehalts. Der rasche Anstieg der Serumharnsäure in den ersten 30 Minuten sowohl nach oraler Xylitgabe als auch bei den Xylitinfusionen ist mit einer Erhöhung der Purin-de-novo-Synthese kaum allein zu erklären. Der stärkste bekannte Stimulator der Purin-de-novo-Synthese beim Menschen, das 2-Äthylamino-1,3,4-thiadiazol, erhöht die Serumharnsäurekonzentration erst nach 24 Stunden (34).

4. Gesteigerter Purinkatabolismus

Für einen weiteren Mechanismus, der wahrscheinlich die Hauptursache der Hyperurikämie nach Xylitgabe ist, sprechen die Veränderungen der intraerythrozytären PRPP-Konzentrationen, die in fast allen unseren Untersuchungen vermindert werden. Da in den Erythrozyten die Reutilisation der Purinbasen stattfinden kann, das heißt die Verwertung von PRPP durch die HGPRTase und die APRTase intakt ist (der Erythrozyt hat nur

einen geringen Gehalt an GPTase¹, spiegeln Änderungen der PRPP-Konzentrationen den Aktionszustand dieses Reutilisationsstoffwechselweges indirekt wider. Eine Verminderung der intraerythrozytären PRPP-Spiegel weist auf einen höheren PRPP-Einbau durch die HGPRTase oder APRTase hin. Als direkter auslösender Mechanismus für diesen gesteigerten PRPP-Einbau kommt ein vermehrter Abbau im Purinstoffwechsel in Frage.

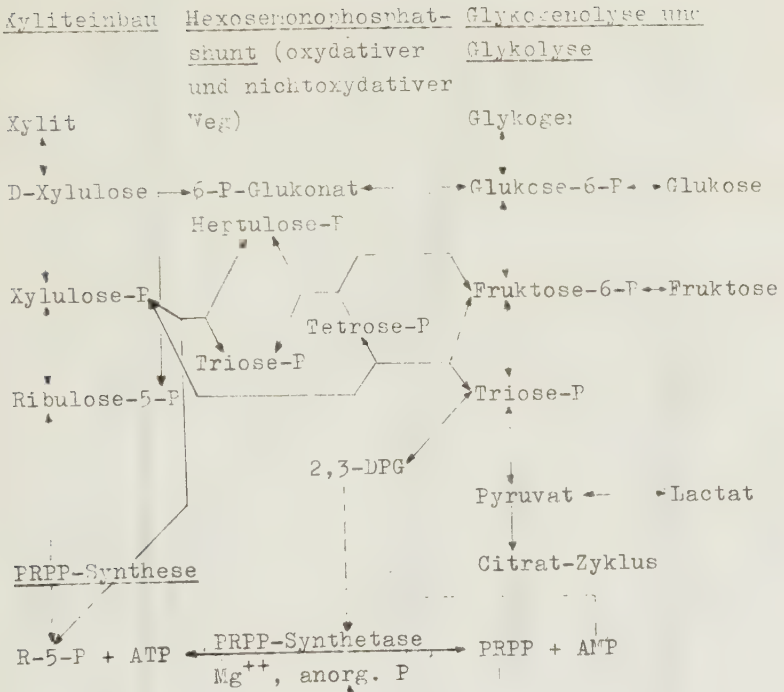
Da anorganisches Phosphat ein Inhibitor für die AMP-Deaminase, die die Umwandlung von AMP zu IMP katalysiert, ist, führen Verminderungen in der Konzentration an anorganischem Phosphat, wie sie nach Xylitgabe beobachtet worden sind, zu einem irreversiblen Abbau von AMP und damit zum Harnsäureanstieg. Ein Teil des bei dieser Degradation anfallenden Hypoxanthins und Xanthins wird nun im Reutilisationsstoffwechsel unter Verwendung von PRPP wieder zu IMP aufgebaut. Bei einem erhöhten Turnover der Nukleotide kommt es so gleichzeitig zu einer Erhöhung der absoluten Konzentrationen von AMP, GMP und IMP. Dies kann wieder zu Einflüssen auf die PRPP-Synthetase im Sinne einer Hemmung führen, und die PRPP-generation erniedrigen.

Die Änderungen der PRPP-Konzentrationen und der PRPP-generation in den Erythrozyten der Versuchspersonen würden somit vor allem für eine Steigerung des Purinkatabolismus als Ursache der durch Xylit induzierten Hyperurikämie sprechen. Der gleiche Mechanismus wird auch für die Erhöhung der Serumharnsäure unter Fruktosebelastung angenommen (24,35,36).

II. Ergebnisse und Diskussion

Serumharnsäurekonzentration, PRPP-Gehalt der Erythrozyten und in vitro PRPP-generation im Hämolysat wurden unter oraler (50 g in 30 Minuten) und konstanter intravenöser (0,3 - 0,5 g/kg KG/Std über fünf Stunden) Xylitbelastung gemessen. Der rasche Anstieg der Harnsäure, der nicht in allen Fällen in eine deutliche Korrelation zur Xylitdosis gebracht werden kann, ist von einem schnellen, signifikanten Abfall der PRPP-Spiegel in den Erythrozyten der Versuchspersonen begleitet. Das Ausmaß des PRPP-Abfalls scheint von der gegebenen Xylitkonzentration abhängig zu sein. Die PRPP-generation im Hämolysat steigt an, sie wird jedoch bei hoher Xylitdosierung gehemmt.

Als mögliche Mechanismen der Hyperurikämie unter Xylitbelastung werden eine Verschiebung im Harnsäurepool, eine verminderte renale Ausscheidung, eine Steigerung der Purin-de-novo-Synthese und ein beschleunigter Abbau der Purinnukleotide diskutiert. Unsere Ergebnisse sprechen am ehesten für einen gesteigerten Purinabbau mit erhöhtem PRPP-Verbrauch durch die Enzyme der Purinreutilisation als Ursache der durch Xylit induzierten Harnsäureerhöhung. Als zusätzliche Möglichkeit ist eine Steigerung der de novo Purinsynthese nach unseren Untersuchungen über die PRPP-generation nicht auszuschließen.



PRPP-Verbrauch

Ribonukleotide durch Purin-
reutilisation (HGPRTase und
APRTase)

Purin-de-novo-Synthese
(PRPP-Amidotransferase)

Pyrimidinsynthese
(OPRTase)

Andere Phosphoribosyltrans-
ferasen

Abbildung 1

↔ Stoffwechselweg - - - - - Hemmung

Xylitol, oral (50 gr in 400 ml water, within 30 min)



Abb. 2

Serumharnsäure

Xylitgabe oral

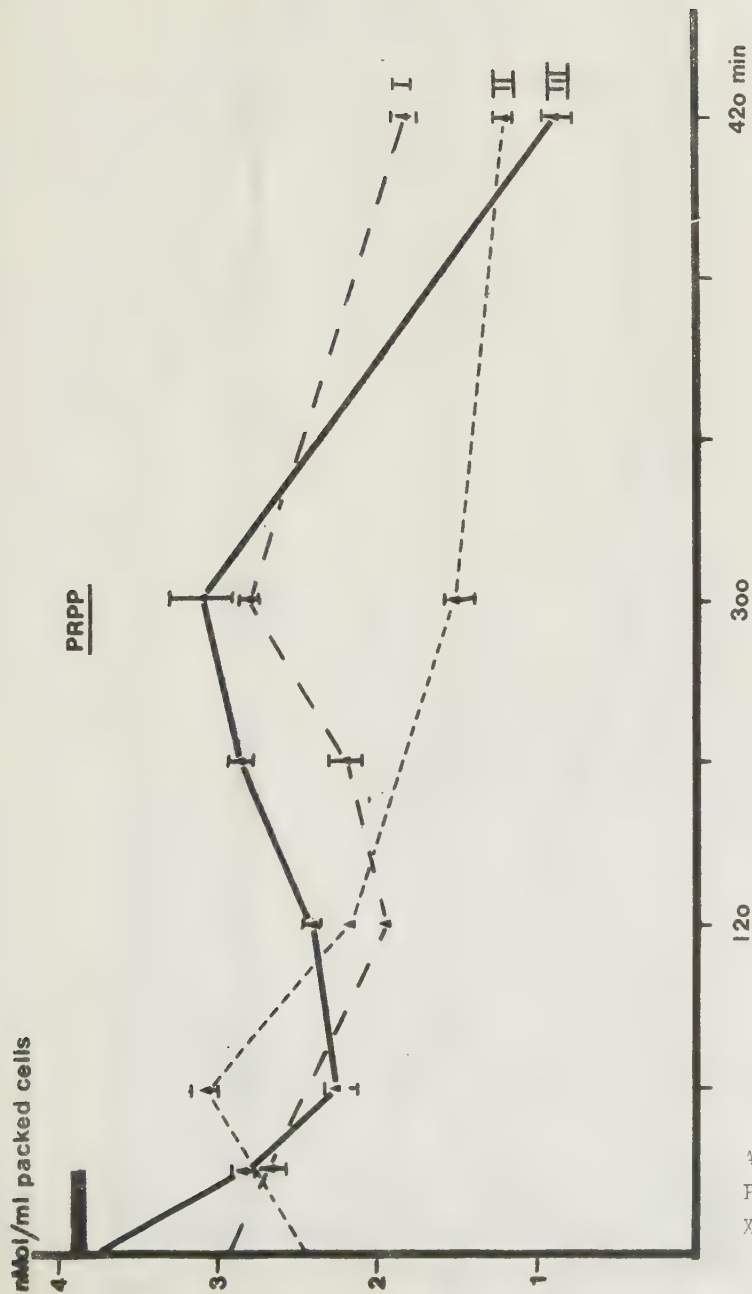


Abb. 3

PRPP-Bestimmung

Xylitgabe oral

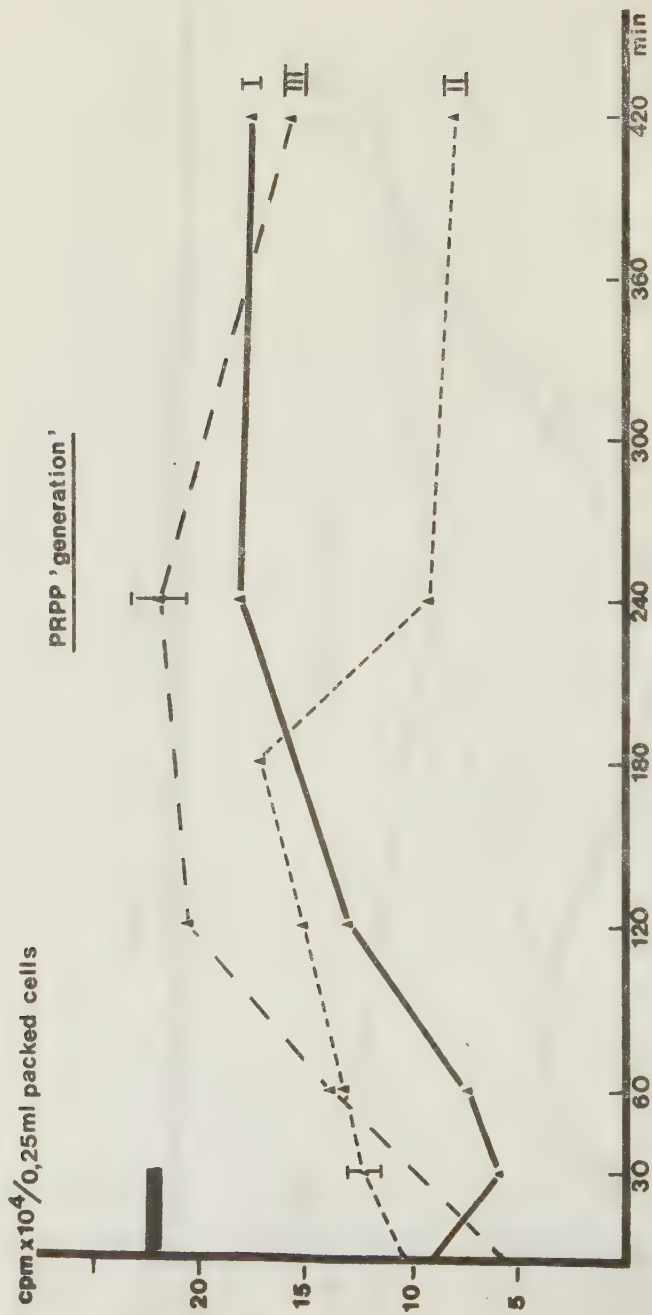


Abb. 4
 , PRPP-generati
 Xylitgabe ora

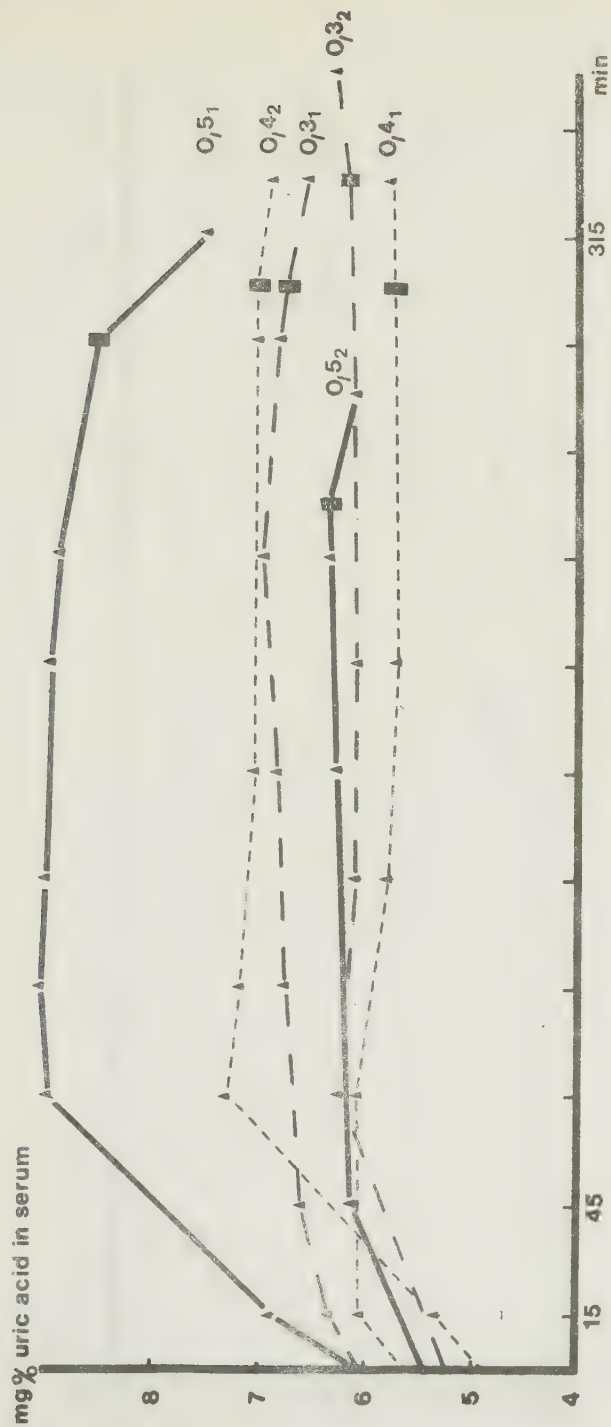


Abb. 5
Serumharnsäure
Xylitininfusionen

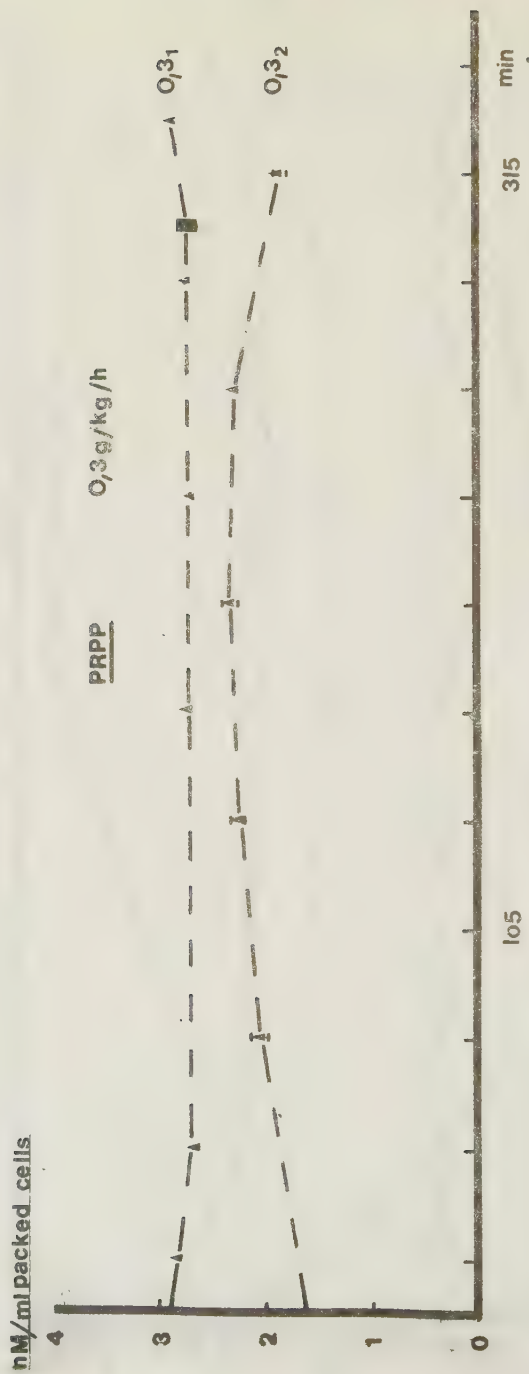
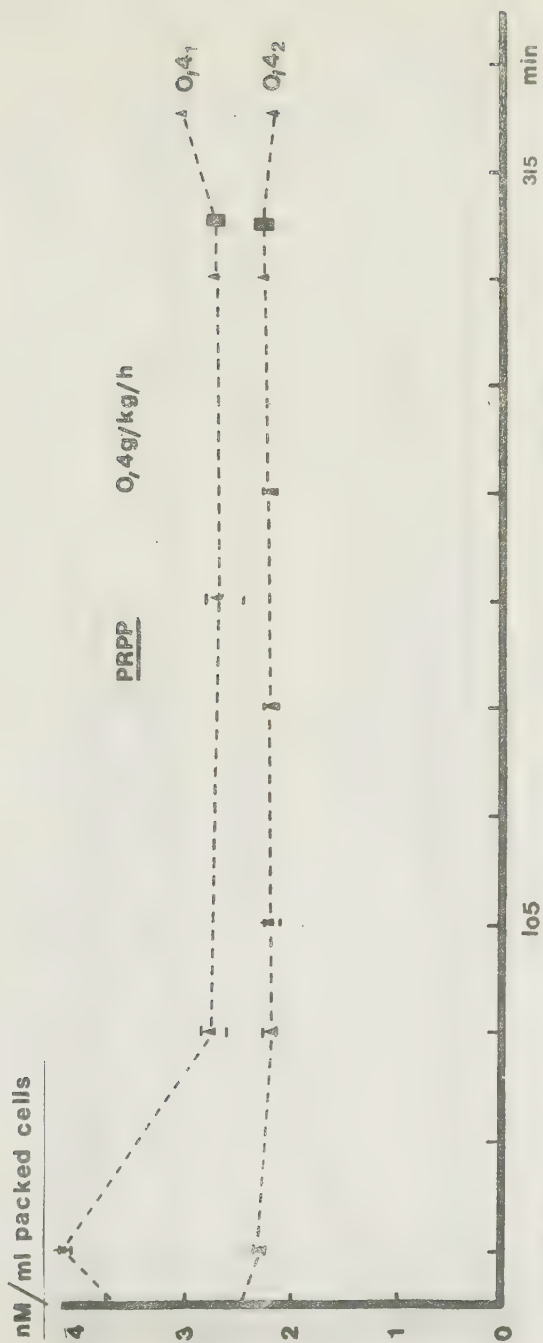


Abb. 6
PRPP-Bestimmung
Xylitininfusionen



Abl. 7
PRPP-Bestimmung
Xylitinfusionen

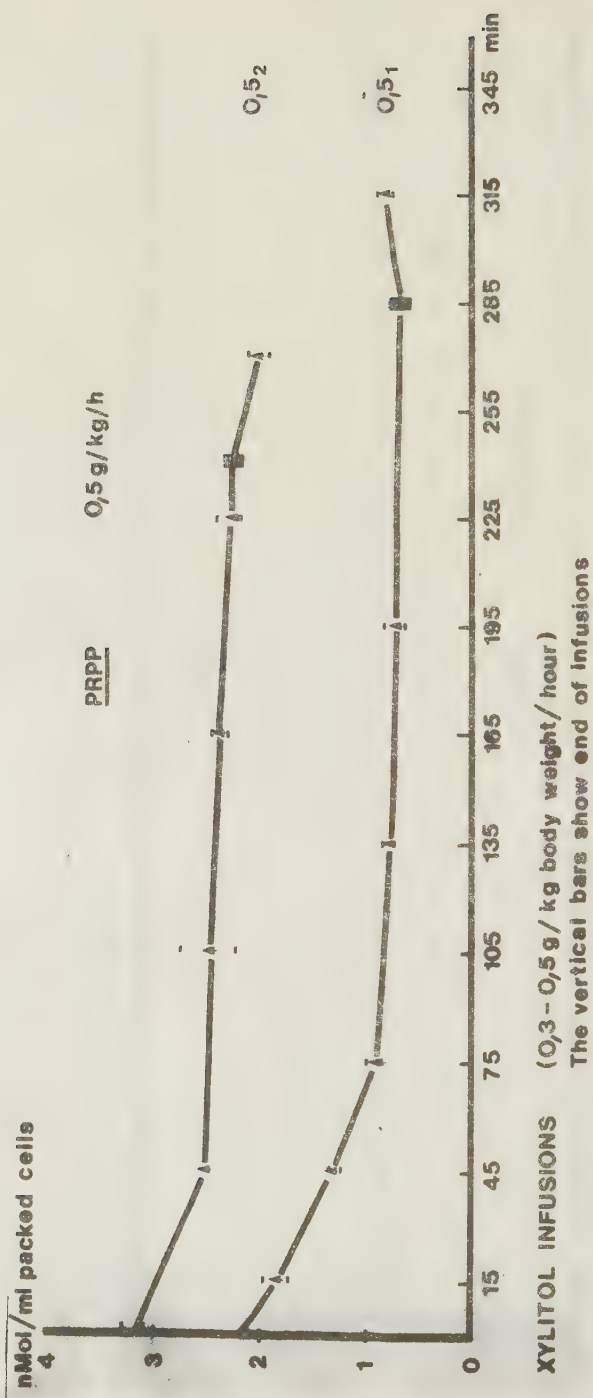


Abb. 8
PRPP-Bestimmung
Xylitinfusion

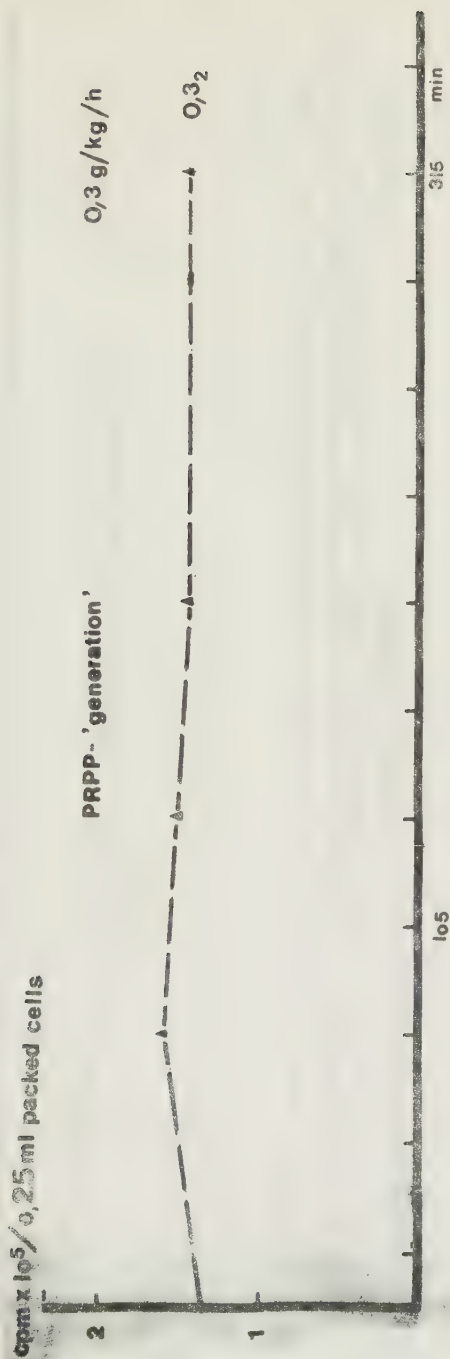


Abb. 9
PRPP-generation
Xylitininfusionen

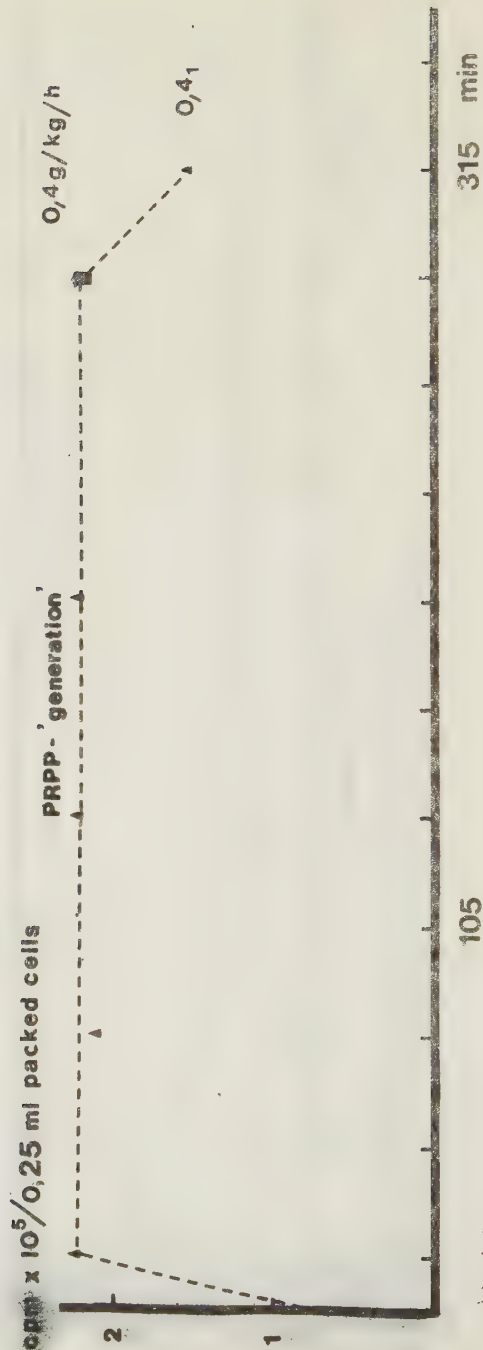


Abb. 10

PRPP-generatio
Xylitininfusione

cpm $\times 10^5 / 0,25$ ml packed cells

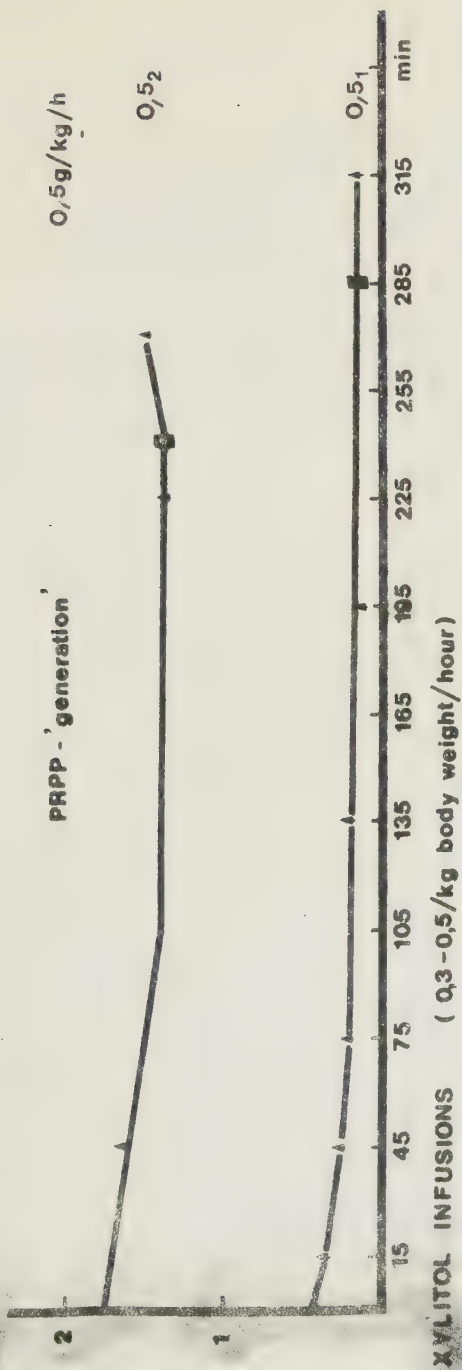


Abb. 11

PRPP-generation

Xylitininfusionen

VIII. Literaturübersicht

1. Greene ML, Seegmiller JE.
Arthritis Rheum. 12,666-667 (1969)
2. Hershko A, Hershko C, Mager J.
Israel Med. Journal 4,939-944 (1968)
3. Kelley WN, Fox IH, Wyngaarden JB.
Clin. Res. 18,457 (1970)
4. Murray AW, Wong PCL.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29,582-587 (1967)
5. Switzer RL.
J. Biol. Chem. 244,2854-2863 (1969)
6. Wong PCL, Murray AW.
Biochemistry 8,1608-1614 (1969)
7. Henderson JF, Khoo KY.
J. Biol. Chem. 240,2349-2357 (1965)
8. Hershko A, Razin A, Mager J.
Biochim. Biophys. Acta 184,64-76 (1969)
9. Henderson JF, Khoo KY.
J. Biol. Chem. 240,2363-2366 (1965)
10. Atkinson DE, Fall L.
J. Biol. Chem. 242,3241-3242 (1967)
11. Goldthwaite DA.
J. Biol. Chem. 222,1051-1068 (1956)
12. Gots JS, Goldstein J.
Science 130,622 (1959)
13. Brockman RW, Chumley SW.
Biochim. Biophys. Acta 95,365 (1965)
14. Nierlich DP, Magasanik B.
J. Biol. Chem. 240,366 (1965)
15. Caskey CT, Ashton DM, Wyngaarden JB.
J. Biol. Chem. 239,2570 (1964)
16. Nierlich DP, Magasanik B.
J. Biol. Chem. 240,358 (1965)
17. Kelley WN, Fox IH, Wyngaarden JB.
Biochim. Biophys. Acta 215,512-516 (1970)

18. Fox IH, Wyngaarden JB, Kelley WN.
New Engl. J. Med. 283,1172-1182 (1970)
19. Kelley WN, Wyngaarden JB.
J. Clin. Invest. 49,602-609 (1970)
20. Kogut MD, Donnell GM, Nyhan WL.
Amer. J. Med. 48,148-161 (1970)
21. Henderson JF, Rosenbloom FM, Kelley WN.
J. Clin. Invest. 47,1511-1516 (1968)
22. Sperling O, Eilam G, Persky-Brosh S, de Vries A.
J. Lab. Clin. Med. 79,1021-1026 (1972)
23. Perheentupa J, Raivio K.
Lancet 2,528 (1967)
24. Fox IH, Kelley WN.
Metabolism 21,713-721 (1972)
25. Heuckenkamp PU, Zöllner N.
Lancet 1,808 (1971)
26. Heuckenkamp PU, Schill K, Zöllner N.
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 77,177 (1971)
27. Bergstrom J, Hultman E, Roch-Norlund AE.
Acta Med. Scand. 184,359 (1968)
28. Thiel H.
Dissertation 1973: Zur Bestimmung von PRPP und der
PRPP-Synthese in intakten Erythrozyten des Menschen
29. Zöllner N.
Z. Klin. Chem. 6,178 (1963)
30. Mehnert H, Förster H.
Lancet 2,1205 (1967)
31. Förster H, Mehnert H, Alhoug I.
Klin. Wschr. 45,436 (1967)
32. Mertz DP, Kaiser V, Klöpfer-Zaar M, Beisbarth H.
Klin. Wschr. 50,1097-1106 (1972)
33. Goto Y, Nagano S, Nakamura H.
Pentosis and Pentitols, Seite 250. Springer Verlag
(1969)
34. Krakoff IH, Balis ME.
J. Clin. Invest. 38,907 (1959)

35. Bode C, Schumacher H, Goebell H, Zelder O, Pelzel H.
Horm. Metab. Res. 3,289 (1971)
36. Mäenpää PH, Raivio KO, Kekomäki MP.
Science 161,1253 (1968)

Lebenslauf

Am 13. Mai 1941 wurde ich, Klaus Norbert Stocker, als Sohn des Ingeneurs und Fahrschulinhabers Norbert Stocker und seiner Ehefrau Elisabeth in Zell am See (Österreich) geboren. Nach der Trennung meiner Eltern mußten meine Mutter, meine Schwester und ich 1945 Österreich verlassen, wir kamen nach Fechenbach/Main, wo ich eingeschult wurde. Im Jahre 1949 zogen wir nach München, hier besuchte ich die Volksschule am Winthirplatz, wechselte 1952 an die Rupprecht-Oberrealschule über und legte dort September 1961 die Reifeprüfung ab. Danach leistete ich ein Jahr Wehrdienst in Kempten und Sigmaringen. Im Wintersemester 1962/63 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Studienfach Mathematik, Wintersemester 1964/65 begann ich Medizin zu studieren und legte 1965 das Vorphysikum, 1967 das Physikum und am 11. August 1970 das Staatsexamen ab. Vom 1. November 1970 bis zum 29. Februar 1972 leistete ich die Medizinalassistentenzeit ab, arbeitete dann bis Februar 1973 als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Poliklinik München und approbierte mich am 26. Februar 1973 als Arzt. Seit 1. März 1973 bin ich an der Medizinischen Poliklinik München in der Facharztausbildung.

